蝗虫微孢子虫对东亚飞蝗卵黄原蛋白含量的影响

陈建新，沈　杰，宋敦伦，张　龙，严毓骅
（中国农业大学植物保护学院，北京　100094）

摘要：采用免疫学方法，对东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 感染蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 后体内卵黄蛋白含量的变化进行了研究。结果表明，感病蝗虫与对照健虫相比，卵黄发生有严重障碍，脂肪体和卵巢中卵黄原蛋白或卵黄蛋白含量极低，导致感病雌虫丧失产卵能力。脂肪体中卵黄原蛋白含量最高峰健虫为 18.7 mg/mL，而病虫只有 4.7 mg/mL；血淋巴中卵黄原蛋白含量最高峰健虫为 7.6 mg/mL，而病虫只有 2.6 mg/mL；卵巢中卵黄蛋白含量最高峰健虫为 73.4 mg/mL，而病虫只有 4.9 mg/mL。

关键词：东亚飞蝗；蝗虫微孢子虫；卵黄发生；卵黄原蛋白；卵黄蛋白
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）02-0170-05

Effect of *Nosema locustae* on the content of vitellogenin of *Locusta migratoria manilensis*

CHEN Jian-Xin，SHEN Jie，SONG Dun-Lun，ZHANG Long，YAN Yu-Hua（Department of Entomology，China Agricultural University，Beijing　100094，China）

Abstract: Changes in the content of vitellogenin in *Locusta migratoria manilensis* infected with *Nosema locustae* were determined by immunology method. The results indicated that vitellogenin did not accomplish in the locust infected，and the contents of vitellogenin in fat body，haemolymph and ovary were very low compared with the control. The maximum content of vitellogenin in fat body in the treatment was 4.663 mg/mL，while the value was 18.655 mg/mL in the control. The maximum content of vitellogenin in haemolymph in the treatment was 2.627 mg/mL，while the value was 7.603 mg/mL in the control. The maximum content of vitellogenin in ovary in the treatment was 4.927 mg/mL while the value was 73.367 mg/mL in the control.

Key words: *Locusta migratoria manilensis*；*Nosema locustae*；vitellogenesis；vitellogenin；vitellin

蝗虫微孢子虫 *Nosema locustae* 是寄生在蝗虫等直翅目昆虫体内的单细胞真核原生动物，主要侵染蝗虫等宿主昆虫的脂肪体（Canning，1953，1962a，1962b），引起宿主的慢性病，因而可作为蝗虫种群密度的长期控制因素（Henry *et al.*，1981）。

近年来，用蝗虫微孢子虫防治蝗虫做了很多研究工作，取得了一定成果（严毓骅等，1994；张龙等，1995a，1995b），然而蝗虫微孢子虫对蝗虫卵黄发生的作用机理研究还未见报道。本文作者用免疫学方法研究了微孢子虫对蝗虫脂肪体、血淋巴中卵黄原蛋白（vitellogenin，Vg）的含量和卵巢中卵黄蛋白（vitellin，Vt）的含量影响，从生理学角度探讨蝗虫微孢子虫对东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 繁殖能力的影响。

1　材料与方法

1.1　供试材料及试剂

病原：蝗虫微孢子虫浓缩液，由中国农业大学植保学院昆虫生防室提供。

健虫饲养：东亚飞蝗卵、成虫由中国农业大学植物保护学院昆虫生物防治室提供。在室内养虫箱饲养；光照养虫箱温度 29℃，相对湿度 70%左右；健康蝗卵孵化后，以新鲜干净的麦苗饲养蝗蝻至所需虫龄，作为对照组试虫；整个饲养过程中定期用次氯酸消毒，防止感染微孢子虫和其它病原微生物。

病虫接种及饲养：取 4 龄健虫，以麦苗浸泡法

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39700098）
第一作者简介：陈建新，女，1942 年生，副教授，研究方向为昆虫生理生化
收稿日期 Received：2000-10-16；接受日期 Accepted：2001-04-30

（微孢子虫孢子浓度为 10^7 个孢子/mL）饲喂一天后放于光照养虫箱中，再以新鲜的小麦叶片饲养，养虫箱温度 29℃，相对湿度 70% 左右，作为接种组试虫。

试剂：主要试剂有石蜡油，北京化工厂；羊毛脂，北京化工厂；巴比妥盐，北京化工厂；氨基黑，上海试剂三厂；DEAE-32 纤维素，上海化学试剂站，进口分装；辣根过氧化物酶，上海丽珠东风生物技术有限公司；硼氢化钠，SIGMA；牛血清蛋白（BSA），德国进口分装。以上试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

Vt 的提取和 Vt 分子量的测定参照龚和（1988）进行。

Vt 酶标抗体的制备及酶标记免疫吸附测定法（enzyme-linked-immunosorbent assay，ELISA）参照李成文（1992）进行。

免疫原的制备：将石蜡油和羊毛脂按体积比 4∶1 混合，高压灭菌 30 min，制成福氏不完全佐剂，再加等体积抗原，用研磨法研磨至完全乳化，即成为福氏佐剂抗原液。

免疫家兔：在家兔的背部及臀部肌肉多点注射，首次注射含 5 mg Vt 的免疫原，1 周后第 2 次注射含 5 mg Vt 的水剂，共进行 4 次免疫。

双向免疫扩散：将 2.5～4 mL 1% 的 pH 8.6 巴比妥盐离子琼脂凝胶沸水融化后，冷却至 50℃左右，倒于平放的载玻片，室温放置 15 min，再 4℃放置 10 min，用打孔器打成孔径为 3 mm 的梅花图形。每孔点样 5 μL，在 37℃温箱扩散 12 h 后，用生理盐水洗掉多余的和非特异性蛋白，0.02% 氨基黑染色，5% 醋酸脱色，在凝胶图像分析系统中照相。

抗血清制备：在第 3 次免疫后 1 周，从兔耳缘静脉少量采血，作双向免疫扩散。当抗血清效价达到 1∶16 以上时，即可在第 4 次免疫后杀兔取血。

抗体 IgG 的纯化：称取 DEAE-32 纤维素（0.01 mol/L pH 8.0 PB 平衡），按 5 g 重加入用双蒸水以 1∶3 稀释的兔血清 4 mL，4℃吸附杂蛋白 1 h，每 10 min 充分搅拌 1 次。最后用水泵抽干，滤液即为纯化的抗体 IgG 蛋白液，再经冰冻干燥成干粉，分装后 －20℃保存。

酶标抗体的制备：把 4 mg 辣根过氧化物酶加入 1 mL 蒸馏水和 0.2 mL 30 mg/mL $NaIO_4$ 中，搅拌 20 min，用 0.001 mol/L NaAc 透析 4 h，用 20 μL 0.2 mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液将醛化的辣根过氧化物酶调至 pH 9.0～9.5，立即加入 5 mg 抗体 IgG 室温搅拌 2 h，加入 0.1 mL（4 mg/mL）现配的硼氢化钠 4℃搅拌 2 h，在 500 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液（pH 7.2）4℃透析过夜，测定 OD_{260} 和 OD_{280} 值，加入 BSA 补到 10 mg/mL 蛋白浓度，分装低温保存。

酶标抗体效价测定：将 Vt 分别以 10 ng/mL、100 ng/mL、1 μg/mL、10 μg/mL 的浓度包板，并按 1∶125，1∶250，1∶500，1∶1 000，1∶2 000，1∶4 000 的浓度加入酶标抗体，用 ELISA 测定效价。

ELISA 测定：将待测抗原（100 μL/孔）包板，4℃过夜，封闭液（100 μL/孔）封板，37℃ 1 h。PBST 洗板 3 次，5 min/次。抗 Vt 酶标抗体（100 μL/孔），37℃ 1 h。洗板 3 次。显色剂（100 μL/孔），37℃显色 10 min。1 mol/L H_2SO_4（100 μL/孔）终止反应。测 OD_{450} 值。

Vt 标准曲线测定：将 Vt 稀释成 7.8 ng/mL～1 000 ng/mL，酶标抗体按 1∶500 稀释，进行 ELISA 测定，并拟合出标准方程：$y = 174.3x^{2.2308}$，再取对数即为 $\lg Y = 2.2308 \lg x + 2.2413$。

血淋巴样品的制备：用毛细管取 25 μL 的血淋巴，溶于 2 mL 0.4 mol/L NaCl 溶液。

脂肪体样品的制备：在冰台上取雌虫腹部脂肪体，在 PBS 缓冲液中充分漂洗后，用滤纸吸掉水分，在 2 mL 0.4 mol/L NaCl 溶液中充分匀浆，1 000 r/min 离心 20 min，收集上清液，－20℃保存备用。

卵巢样品的制备：在冰台上取雌虫卵巢，在 PBS 缓冲液中充分漂洗后，用滤纸吸掉水分，在 2 mL 0.4 mol/L NaCl 溶液中充分匀浆，1 000 r/min 离心 20 min，收集上清液，－20℃保存备用。

Vt 或 Vg 含量的测定：将待测样品用包被液稀释 100 倍，再按 ELISA 法分别测定血淋巴、脂肪体和卵巢样品中的 OD 值，重复 3 次，取平均值，根据标准方程计算出 Vt 或 Vg 的含量。

2 结果

2.1 东亚飞蝗卵黄蛋白的提取

将提取后的 Vt 经 SDS-PAGE 电泳，在凝胶图像分析系统照相并计算其相对分子质量，如图 1 所示，东亚飞蝗 Vt 有 6 条带。

2.2 IgG 的纯化

将纯化后的 IgG 经电泳后可见只有少量的 α-与 β-球蛋白，γ-球蛋白目测含量远在 95% 以上，如图 2 所示。说明 IgG 的纯化是成功的。

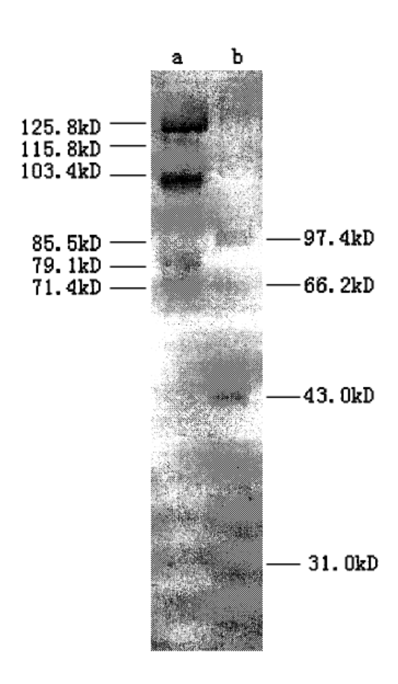


图 1 卵黄蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of vitellin

a. 卵黄蛋白 vitellin; b. 标准分子量 MW markers

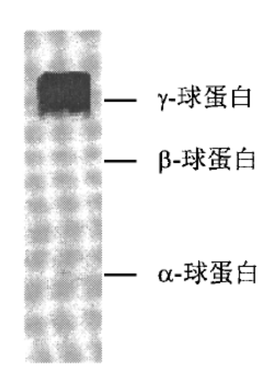


图 2 IgG 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of the purified IgG

2.3 酶标抗体效价的测定

将卵黄蛋白稀释成 1 μg/mL ~ 100 ng/mL，将酶标抗体稀释成 1:125 ~ 1:4 000，按 ELISA 法测定酶标抗体的效价，结果见表 1。由表 1 可知，抗原浓度在 100 ng/mL 时，OD 值呈现明显的梯度变化，酶标抗体在 1:500 时 OD 值接近 0.8，因此以后按 1:500 效价使用。

表 1 酶标抗体效价的测定

Table 1 Titer determination of antibody

卵黄蛋白浓度 Concentration of vitellin	抗体浓度 Concentration of antibody					
	1:125	1:250	1:500	1:1 000	1:2 000	1:4 000
10 ng/mL	0.447	0.379	0.277	0.091	0.049	0.030
100 ng/mL	1.498	1.100	0.788	0.409	0.223	0.117
1 μg/mL	1.940	1.881	1.867	1.727	1.451	1.008
10 μg/mL	1.967	1.921	1.922	1.805	1.627	0.069

2.4 脂肪体中卵黄原蛋白含量变化

感病蝗虫脂肪体中 Vg 的含量比对照组大大降低，在接种后 3 天内及接种 11 天以后含量极低，在 5 ~ 7 天达到最高（4.663 mg/mL）。对照组自第 3 天后 Vg 含量迅速上升，第 7 天达到最高（18.655 mg/mL），然后开始下降，在 9 ~ 15 天基本保持稳定（图 3）。说明感病蝗虫的脂肪体被微孢子虫寄生后，合成 Vg 的能力大大降低。

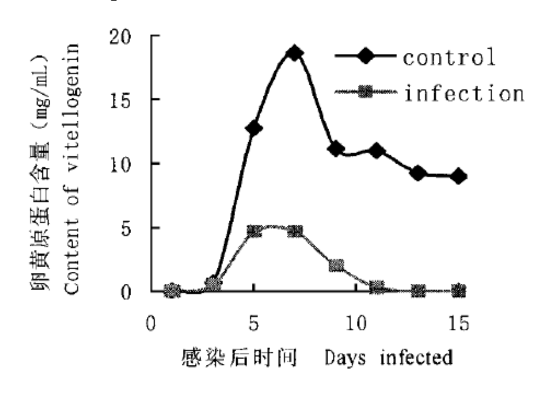


图 3 4 龄蝗蝻感染微孢子虫后脂肪体中 Vg 含量与时间的关系

Fig. 3 Changes in the content of vitellogenin in fat body after the fourth instar nymph infected

2.5 血淋巴中卵黄原蛋白含量变化

感病蝗虫血淋巴中 Vg 含量比对照组大大降低，在接种后 3 天内和接种 9 天以后含量极低，在 5 ~ 7 天达到最高（2.627 mg/mL）。对照组自第 3 天后 Vg 含量迅速上升，第 7 天达到最高（7.603 mg/mL），然后开始下降，在 9 ~ 15 天基本保持稳定（图 4）。说明感病蝗虫的脂肪体被微孢子虫寄生后，向血淋巴中释放的 Vg 量大大降低。

2.6 卵巢中卵黄蛋白的含量变化

感病蝗虫卵巢中 Vt 含量比对照组大大降低，在接种后 1 ~ 15 天含量始终很低（最高为 4.927 mg/mL）。对照组自第 7 天后 Vt 含量迅速上升，第 13 天达到最高（73.367 mg/mL），13 ~ 15 天基本保

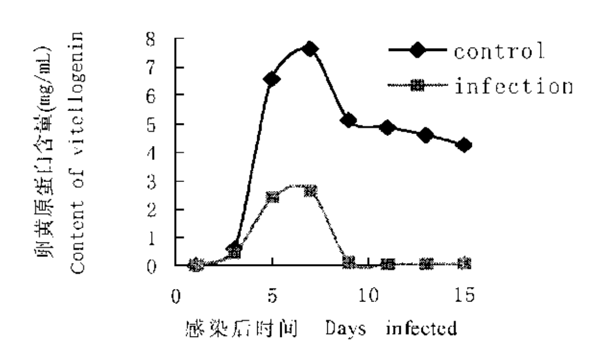


图 4 4 龄蝗蝻感染微孢子虫后血淋巴中 Vg 含量与时间的关系

Fig. 4 Changes in the content of vitellogenin in haemolymph after the fourth instar nymph infected

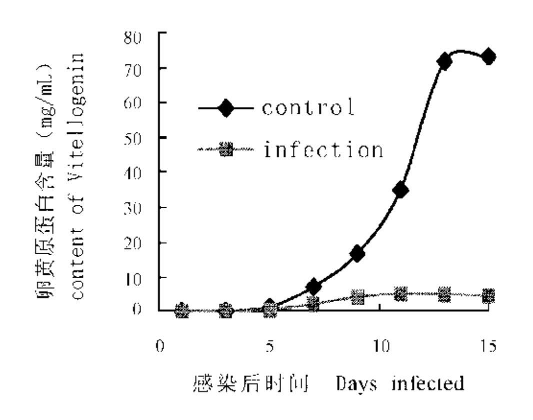


图 5 4 龄蝗蝻感染微孢子虫后卵巢 Vt 含量与时间的关系

Fig. 5 Changes in the content of vitellin in ovary after the fourth instar nymph infected

持稳定（图 5）。说明感病蝗虫的卵巢由于从血淋巴中摄取的 Vg 太少而严重发育不良。

3 讨论

蝗虫 Vt 经提取、SDS-PAGE 电泳后，在凝胶图像分析系统照相并计算其相对分子质量，如图 1 所示，东亚飞蝗 Vt 有 6 条带，带数与文献报道相同，但分子量与文献略有差异，可能是由于方法不同所致（Chen *et al.*，1978；Chinzei *et al.*，1981；Thomas *et al.*，1987）。

昆虫卵的形成和发育与脂肪体密切相关，Vg 合成的重要场所便是脂肪体，Vg 合成后通过血淋巴输送给卵母细胞，通过胞饮作用进入卵母细胞成为卵母细胞的 Vt（Thomas *et al.*，1987）。感病雌虫由于脂肪体营养物质被严重消耗，导致 Vg 合成受阻，使卵母细胞不能正常沉积卵黄，卵巢发育不良。同时由于感病成虫食量大减，更不能为卵的发育提供足够的全面的营养（Thomas *et al.*，1987）。

本实验证明感病蝗虫的脂肪体合成 Vg 的能力明显下降，导致向血淋巴库中的 Vg 释放量严重不足，最终使得卵母细胞无法从血淋巴中摄取足量的 Vg，整个卵巢发育严重不良，Vt 含量极低，而且在实验中观察到所有接种的病雌虫都没有产卵。蝗虫微孢子虫的寄生，可导致感病蝗虫脂肪物质的大量消耗（陈建新等，2000），使得脂肪体合成 Vg 的场所及其功能被破坏，直接导致繁殖能力的削弱甚至丧失。

综上所述，蝗虫被微孢子虫寄生后对蝗虫繁殖能力确实影响很大，而昆虫繁殖是受体内内分泌系统直接控制的，如脑激素、保幼激素等对蝗虫脂肪体合成 Vg 起启动活化作用（Mordue *et al.*， 1980），而微孢子虫寄生后对蝗虫内分泌的影响，有待今后进一步研究。

参 考 文 献 （References）

Canning E U，1953. A new microsporidian，*Nosema locustae* n. sp. from the fat body of the African migratory locust *Locusta migratoria migratorioides*（R. & F.）. *Parasitology*，43：187－290.

Canning E U，1962a. The life cycle of *Nosema locustae* Canning in *Locusta migratoria migratorioides*（R. & F.）and its infectivity to other hosts. *J. Inver. Pathol.*，4：237－247.

Canning E U，1962b. The pathologenicity of *Nosema locustae* Canning. *J. Insect Pathol.*，4：248－256.

Chen J X，Shen J，Song D L，Zhang L，Yan Y H，2000. Effect of *Nosema locustae* on the content of fat in *Locusta migratoria manilensis*. *Acta Entomol. Sin.*，43（Suppl.）：109－113.［陈建新，沈杰，宋敦伦，张龙，严毓骅，2000. 蝗虫微孢子虫对蝗虫脂肪含量的影响. 昆虫学报，43（增刊）：109－113］

Chen T T，Strahlendorf P，Wyatt G R，1978. Vitellin and vitellogenin from locusts（*Locusta migratoria*）：properties and post-translational modification in the fat body. *J. Biol. Chem.*，253：5 324－5 331.

Chinzei Y，Chino H，Wyatt G R，1981. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*，11（6）：701－705.

Gong H，1988. Experimental technique for immunology of insect vitellin. In：Guo F，Xin J L ed. Experimental Techniques for Entomology. Beijing：Science Press. 181-187.［龚和，1988. 昆虫卵黄蛋白的免疫学实验技术. 见：郭郛，忻介六主编. 昆虫学实验技术. 北京：科学出版社. 181－187］

Henry J E，Oma E A，1981. Pest control by *Nosema locustae*，a pathogen of grasshoppers and crickets. In：Burges H D ed. Microbial Control of Pests and Plant Diseases（1970-1980）. Academic Press. 573－586.

Li C W，1992. Modern Techniques for Immunochemistry. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press. 71-78.［李成文，1992. 现代免疫化学技术. 上海：上海科学技术出版社. 71 – 78］

Mordue W，Goldsworthy G J，Brady J，Blaney W M，1980. Insect Physiology. Blackwell Scientific Publications. Oxford London Edinburgh. Boston Melbourne. 48 – 49.

Thomas T，Chen L，Hillen J，1987. Expression of insect vitellogenin gene. *Advance in Insect Physiology*，4: 137 – 151.［Thomas T，Chen L，Hillen J，1987. 昆虫卵黄原蛋白基因的表达. 昆虫生理学研究进展，4: 137 – 151］

Yan Y H，Zhang L，1994. Progress in the locusts control with microsporids in China. *Plant Protection Technology and Extension*，1: 43 – 46.［严毓骅，张龙，1994. 我国蝗虫微孢子虫治蝗的进展. 植保技术与推广，1：43 – 46］

Zhang L，Yan Y H，Li G B，Cao Y Z，1995a. The effect of *Nosema locustae* infection on flying ability of locust（*Locust migratoria manilensis*）. *Acta Agrestia Sinica*，3（4）: 324 – 327.［张龙，严毓骅，李光博，曹雅忠，1995a. 蝗虫微孢子虫病对东亚飞蝗飞翔能力的影响. 草地学报，3（4）：324 – 327］

Zhang L，Zhou H Y，1995b. Infection of female reproductive organs of the oriental migratory locust（*Locusta migratoria manilensis*）by *Nosema locustae*（Microsporida: Nosematidae）. *Chinese Journal of Biological Control*，11（2）: 93 – 94.［张龙，周海鹰，1995b. 蝗虫微孢子虫对雌性东亚飞蝗生殖器官侵染的初步观察. 中国生物防治，11（2）: 93 – 94］